

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H04302
研究課題名(和文) iPS細胞を用いた皮質脊髄路再構築による運動機能再生

研究課題名(英文) Reconstruction of cerebrospinal pathway using iPS cells

研究代表者
高橋 淳 (TAKAHASHI, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：10270779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)からの大脳オルガノイドに成功し、国際誌に報告した(Sakaguchi et al. Stem Cell Rep. 2019)。続いて、このヒト大脳オルガノイド細胞をマウス大脳に移植し、細胞生着や軸索伸展を検討した。その結果、分化早期(6週)オルガノイドの方が後期(10週)と比べてより多くの軸索をより遠くまで(脊髄まで)伸ばすことが明らかになった。しかし、より多くの増殖性神経前駆細胞を含むため移植片の過増大が認めらるという課題も明らかとなった。この結果は国際誌に現在投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管疾患の患者数は100万人を超え、その後遺症による運動麻痺は要介護原因の1位を占める。その他、頭部外傷や筋萎縮性側索後遺症(ALS)など皮質脊髄路を形成する大脳運動ニューロンの障害のために非可逆的な運動機能低下に陥る患者は多く、患者福祉はもちろん医療経済的にもその治療法開発は急務である。本研究では、細胞移植と遺伝子治療の相乗効果により皮質脊髄路を再構築し、運動機能低下に対する再生医療技術の確立を目指す。

この成果は脳血管障害患者の症状改善だけでなく、全ての脳機能障害患者の症状改善に対する本質的かつ革新的治療アプローチとなる可能性を含んでいる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to induce cerebral organoids from human ES/iPS cells, and reported the results (Sakaguchi et al. Stem Cell Rep 2019). Next we transplanted the cerebral organoids into murine brain and found that early-stage organoids survive better and extend more axons along cerebrospinal tract, and that they showed neural overgrowth due to proliferating progenitors. The results are now under submission to an international journal.

研究分野：再生医療

キーワード：神経再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

① 脳血管障害後遺症等に対する再生医療技術開発は急務である。

厚生労働省の主な傷病の総患者数統計（平成26年度）によると、脳血管疾患は117.9万人である（ちなみに、高血圧1010.8万人、糖尿病316.6万人、悪性新生物162.6万人）。また医療費（平成25年度）をみると、40.6兆円のうち循環器系の疾患が最も多く5.8兆円。うち脳血管疾患が1.77兆円を占める（高血圧性疾患1.88兆円）。要介護になった主な原因（平成25年度）では、脳血管疾患は21.7%で第1位（ちなみに2位は認知症21.4%）。最重症度の要介護5（全介助）でみると、脳血管疾患34.5%（1位）とさらに上昇する。

脳血管障害以外にも脳損傷やALSなど大脳運動ニューロン障害による運動機能低下は数多く、これらの疾患に対する治療は、患者数、医療費、要介護の原因から考えて、患者福祉のみならず医療経済、労働力確保という観点からも重要であり、非可逆的運動機能低下に対する再生医療技術開発は急を要する。

② これまでの神経細胞保護・賦活治療では効果に限界がある。

脳血管障害や脳損傷に対して、これまで数多くの神経細胞保護・賦活剤や血流改善剤が開発されてきた。しかし、明らかな臨床効果が得られず承認を抹消されたものも多く、そもそも上に挙げたような多くの後遺症患者の存在が、神経細胞保護・賦活治療の限界を物語っている。

近年では間葉系幹細胞や神経幹細胞を用いた脳血管障害・脳損傷治療が行われているが、これらもサイトカイン効果による神経細胞保護や神経（幹）細胞賦活を目指す治療であり、これまでの薬物治療を大きく上回る効果は期待できない。根本的な治療効果を発揮するためには、皮質脊髄路そのものを再構築する必要がある。

③ 申請者はiPS細胞を用いた神経疾患治療法開発のノウハウを有している。

申請者は、これまでiPS細胞を用いたパーキンソン病治療の開発を進めてきた。ヒトiPS細胞からの効率的な神経誘導、さらにはセルソーティング技術の活用により、安全性・有効性の高いドパミン神経前駆細胞の作製に成功した。さらに宿主脳環境改善による細胞生着改善やシナプス形成促進にも成功している。

本研究では、ヒトiPS細胞からの大脳皮質運動ニューロンの誘導、さらにはその移植による皮質脊髄路再構築、運動機能改善を目指している。ある特定の神経細胞の誘導、移植後の機能評価、さらにはそれらの技術を実際の臨床応用にまで繋げる過程を経験しているので、研究開発を無駄なくスピーディーに進めることができる。

④ 神経細胞移植による皮質脊髄路再構築が報告されている。

マウス大脳皮質運動野損傷モデルにおいては、傷害された運動野へ胎仔運動野組織を移植することにより、傷害された皮質脊髄路が移植細胞によって一部再構築されることが報告されている（Gaillard et al, Nat Neurosci 2007）。一方、マウスやヒトES細胞由来の大脳皮質神経細胞をラット脳内に移植すると脊髄に向かって長く軸索を伸ばすことも報告されている（Ideguchi et al. J Neurosci 2010 右図; Michelsen et al. Neuron 2015）。これらの結果は、多能性幹細胞から誘導した大脳運動ニューロンの移植によって皮質脊髄路が再構築されうることを示す。

2. 研究の目的

脳血管疾患の患者数は100万人を超え、その後遺症による運動麻痺は要介護原因の1位を占める。その他、頭部外傷や筋萎縮性側索後遺症（ALS）など皮質脊髄路を形成する大脳運動ニューロンの障害のために非可逆的な運動機能低下に陥る患者は多く、患者福祉はもちろん医療経済的にもその治療法開発は急務である。本研究では、細胞移植と遺伝子治療の相乗効果により皮質脊髄路を再構築し、運動機能低下に対する再生医療技術の確立を目指す。

上記の背景に基づき、達成目標は、①ヒト iPS 細胞由来大脳運動ニューロンの移植による皮質脊髄路の再構築、②遺伝子治療によるホスト脳環境の至適化であり、③これらの組み合わせによる相乗効果を目指す。この成果は脳血管障害患者の症状改善だけでなく、全ての脳機能障害患者の症状改善に対する本質的かつ革新的治療アプローチとなる可能性を含んでいる。

ヒト iPS 細胞からの大脳皮質組織の誘導、およびソーティング技術による運動ニューロンの濃縮と脳損傷モデル動物に対する移植を行う。大脳皮質の分化誘導に関して、近年ヒト多能性幹細胞を用いて3次元下に大脳皮質を誘導する事で、層構造を持った大脳皮質や海馬、脈絡叢等の大脳皮質周辺領域の誘導が可能となった(Kadoshima et al. PNAS. 2013, Sakaguchi et al. Nat Comm. 2015)。これらの技術を基にヒト iPS 細胞から移植可能な大脳皮質組織の誘導を行う。特に運動機能の改善に関してはソーティング技術を用いて運動ニューロンを純化して移植を行う事を目指し、脳損傷ラットへの移植後の組織学的解析によって大脳皮質脊髄路の再構築を証明する。また、大脳皮質から脊髄までの長い軸索伸展を支持かつ誘導する目的で、BDNF などの神経栄養因子やコンドロイチナーゼ ABC などの軸索伸展阻害因子抑制タンパクを、ウイルスベクターを用いて神経回路に沿って発現させる。これらの相乗効果も明らかにする。

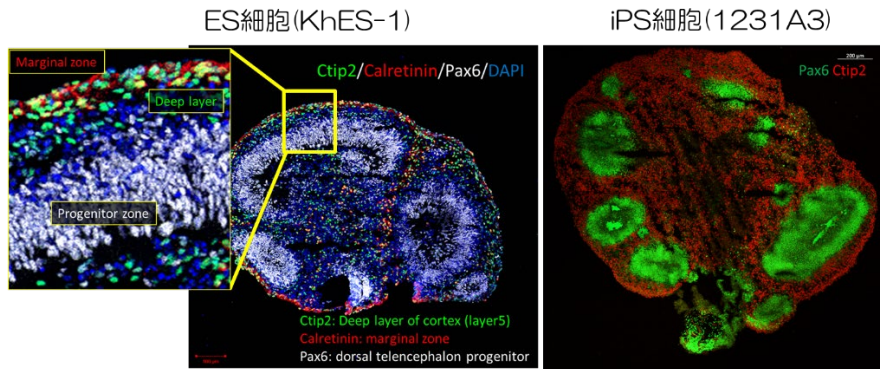
3. 研究の方法

本研究では、脳梗塞や頭部外傷・変性疾患等による運動機能障害に対する根本的治療として、iPS細胞を用いた大脳皮質脊髄路の再構築を目的とする。さらにその効率を上げるために、遺伝子導入の技術を用いてホスト脳環境を至適化する。このために、まず①3次元培養に適切な分化誘導因子を加えることにより、ヒト iPS 細胞からの大脳皮質組織誘導法を確立する。②誘導された細胞の中でも皮質脊髄路形成に寄与する細胞をできるかぎり濃縮し、移植の有効性と安全性を高める。さらに、③細胞生着や軸索伸展を支持するホスト脳環境を明らかにし、それに関わる分子メカニズムを解明する。④同定した因子、あるいはすでに知られている神経栄養因子などを、ウイルスベクターを利用してホスト脳で発現させることで、細胞生着や軸索伸展を促進させる。最後に⑤細胞移植による行動改善の有無について検証する。

4. 研究成果

まず、ヒト多能性幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）からの大脳ニューロン誘導に取り組んだ。TGF/Actibin 阻害薬と Wnt 阻害薬を同時に作用させることにより神経誘導を促し(SFEBq 法)、大脳オルガノイドを形成させることにより、初期大脳の層状構造形成が確認された。免疫組織学的解析により ventricular zone、intermediate zone、cortical plate であることが確認され、大脳第5層のマーカーである Ctip2 も発現しており、将来の運動ニューロンも含まれていること

が示唆された。この成果は国際誌にて発表した（下図；文献1）。



続いて、このヒト大脳オルガノイド細胞をマウスおよびカニクイザルの大脳に移植し、細胞生着や軸索伸展を検討した。その際に脳オルガノイドの分化誘導の長さに着目し、6週間（深部ニューロンを産生している時期）と10週間（主に浅部ニューロンを産生する時期）を比較した。その結果、6週オルガノイドの方がより多くの軸索をより遠くまで（脊髄まで）伸ばすことが明らかになった。しかし、より多くの増殖性神経前駆細胞を含むため移植片の過増大が認められ、この過増大の抑制が課題であることが明らかになった。この成果は国際誌に現在投稿中である。

(1) Sakaguchi H, Ozaki Y, Ashida T, Matsubara T, Oishi N, Kihara S, Takahashi J. Self-organized synchronous calcium transients in a cultured human neural network derived from cerebral organoids. *Stem Cell Rep.* 13(3): 458-473 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaguchi H, Ozaki Y, Ashida T, Matsubara T, Oishi N, Kihara S, Takahashi J	4. 巻 13
2. 論文標題 Self-organized synchronous calcium transients in a cultured human neural network derived from cerebral organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 458-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Bumpei Samata
2. 発表標題 ENRICHMENT OF MOUSE SUBCEREBRAL PROJECTION NEURONS USING L1CAM
3. 学会等名 ISSCR Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideya Sakaguchi
2. 発表標題 SELF-ORGANIZED SYNCHRONIZATION IN HUMAN NEURONAL NETWORK ACTIVITY DERIVED FROM CEREBRAL ORGANOID
3. 学会等名 ISSCR Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって掲載されるヒト多能性幹細胞由来の脳オルガノイド～イメージングによる多面的評価と新しいアプローチ～
3. 学会等名 第1回イノベーションフォーラム・ジャパン大阪-再生医療研究を'治療'に繋げる最先端技術
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の海馬、大脳皮質、および脊髄組織
3. 学会等名 金沢大学(河崎洋志研究室)セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideya Sakaguchi
2. 発表標題 Self-organized human neuronal network activity derived from cerebral organoids
3. 学会等名 Neuroscience 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の海馬、大脳皮質、および脊髄、大脳皮質組織とその神経活動へのアプローチ
3. 学会等名 奈良先端科学技術大学院大学 研究科セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bumpei Samata
2. 発表標題 Purification of Mouse Cortical Neurons
3. 学会等名 ISSCR 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideya Sakaguchi
2. 発表標題 Three-dimensional Evaluation of Human Embryonic Stem Cell-derived Cerebral Organoid
3. 学会等名 ISSCR 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 ヒト胚性幹細胞由来の背内側終脳領域からの機能的な海馬神経細胞の生成
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bumpei Samata
2. 発表標題 A possible cell surface marker to enrich cortical motor neurons
3. 学会等名 14th International Symposium on Neural Transplantation & Repair (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の3次元大脳組織
3. 学会等名 Japan Spotfire User Group Meeting (Spotfire総会 2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口 秀哉
2. 発表標題 細胞の自己組織化能によって形成されるヒト多能性幹細胞由来の海馬および大脳組織
3. 学会等名 平成29年度ライフサイエンスイノベーション推進機構セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 淳
2. 発表標題 Generation of cortical motor neurons from iPS cells
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 大脳皮質細胞からのL1CAM陽性細胞の取得およびその細胞製剤としての使用	発明者 高橋 淳、佐俣 文 平、佐野 徳隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-247960	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----